

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Senyawa Kode Pc-2 dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara *In-vivo*

Yustina Sri Hartini^{*1}, Subagus Wahyuono², Sitarina Widyarini³, Ag. Yuswanto²

¹Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, ² Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada,

³Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

Kampus III USD Paingan Maguwoharjo Depok Sleman Yogyakarta

*Penulis korespondensi: Yustina Sri Hartini, e-mail: yustinahartini@usd.ac.id

Penelitian terkait aplikasi imunostimulan sebagai aktivator sistem imun hasilnya tidak meyakinkan dan perlu pencarian imunostimulan baru dari sumber baru. Secara empiris daun sirih merah banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, banyak tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional dilaporkan memiliki aktivitas imunostimulan. Telah dilakukan isolasi senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah dan pengujian aktivitas fagositosis makrofag secara *in-vivo*. Ekstrak metanolik daun sirih merah diperoleh secara maserasi, difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum, dan senyawa kode Pc-2 diisolasi dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif. Kandungan senyawa dalam ekstrak, fraksi, dan isolat dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Pengujian aktivitas fagositosis makrofag menggunakan mencit BALB/c dan induksi dengan bakteri *Lysteria monocytogenes*. Aktivitas fagositosis dinyatakan dalam persen fagositosis (PF), indeks fagositosis (IF), dan efektivitas fagositosis (EF). Hasil penelitian menunjukkan bahwa mencit yang diberi perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgBB baik pada hari ke-3, ke-10, maupun ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*, mempunyai PF, IF, dan EF yang lebih besar secara bermakna dibandingkan pada mencit kelompok kontrol; aktivitas fagositosis makrofag terbesar terjadi pada hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*; dan tidak ada korelasi antara PF dengan IF.

Kata kunci : fagositosis makrofag, *in-vivo*, isolat, *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Pengantar

Sistem imun merupakan lini pertama pertahanan tubuh manusia, melindunginya dari penyakit dan mengobatinya apabila telah terjadi penyakit (Buhner, 1999). Tubuh manusia secara terus menerus terpejan oleh berbagai faktor yang berdampak pada melemahnya fungsi sistem imun dan meningkatkan imunosupresi. Penelitian terkait aplikasi imunostimulan sebagai aktivator sistem imun hasilnya tidak meyakinkan dan perlu pencarian imunostimulan baru dari sumber baru (Wagner *et al.*, 1999). Beberapa keterbatasan imunostimulan yang ada adalah waktu paruhnya yang singkat serta imunitas yang dihasilkan hanya bersifat parsial, dan tidak stabil, selain itu toksisitas senyawa cukup tinggi terutama pada penggunaan kronis (Iwo, 2006). Secara empiris daun sirih merah banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, banyak tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional dilaporkan memiliki aktivitas imunostimulan (Bafna dan Misrha, 2004). Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) merupakan satu dari 3000 lebih spesies dalam genus *Piper*. Tanaman dalam family *Piperaceae* ini tumbuh merambat, menyukai tempat teduh sehingga dapat tumbuh subur di

daerah pegunungan. Keindahan daun sirih merah yang berwarna merah keperakan dan mengkilap menyebabkan tanaman ini banyak



Gambar 1. Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) (dokumen pribadi)

digunakan sebagai tanaman hias. Akhir-akhir ini daun sirih merah banyak digunakan sebagai obat tradisional, menurut Manoi (2007) sirih merah mempunyai banyak manfaat dalam pengobatan tradisional, berpotensi menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Berbagai penelitian terkait aktivitas sirih merah sudah dilaporkan oleh Sulistyani *et al.* (2007), Agustanti, L. (2008), Suratmo (2008), Safitri dan Rahma (2008), Juliantina *et al.* (2009), Wicaksono *et al.* (2009), Alfarabi *et al.* (2010), Dhewayanti (2010), Sundari (2010), Wiweko (2010), Wahyudi (2010), Sustri *et al.* (2011), Setyowati (2011), Apriyanto (2011), Zubier *et al.* (2010), Fitriyani *et al.* (2011), Yulianti *et al.* (2011), dan Pangabdian (2012). Dari beberapa penelitian tersebut, belum ada laporan penelitian tentang uji aktivitas fagositosis secara *in-vivo* dari senyawa yang diisolasi dari daun sirih merah.

Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman (Wagner *et al.*, 1999). Baru sejumlah kecil tanaman yang telah diskriminasi aktivitas imunostimulannya, dari skrining tersebut terbukti bahwa beberapa tanaman obat memiliki aktivitas imunostimulan akan tetapi tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis, sehingga di masa mendatang penelitian tentang imunostimulator dari tanaman obat sangat bernilai (Kumar *et al.*, 2011). Hartini *et al.* (2011) melaporkan bahwa uji secara *in-vitro* menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit yang diberi perlakuan dengan 75 µg/ml ekstrak metanolik daun sirih merah lebih tinggi secara bermakna dibanding mencit kelompok kontrol dan setara dengan produk obat yang mengandung ekstrak Echinacea 100 µg/ml (obat merek dagang X). Lebih lanjut Kustiawan (2012) melaporkan bahwa dengan uji yang sejenis, 2 senyawa dari ekstrak etanolik daun sirih merah yakni isolat 1 yakni 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl) propoan-

2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone dan isolat 2 yakni *2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone* masing-masing pada 5µg/ml memiliki aktivitas yang sebanding dengan produk obat yang mengandung ekstrak *Echinacea* (obat merek dagang X).

Fagositosis adalah proses dimana sel-sel terlibat dalam penelanan partikel-partikel patogen, dan karena kapasitas sel-sel tersebut maka patogen dapat dimatikan dan dimusnahkan (Desjardins dan Griffiths, 2003). Fagositosis merupakan salah satu hal terpenting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap serangan mikroorganisme. Melalui fagositosis, penyerangan intra-seluler, dan digesti, sel-sel fagosit akan memusnahkan mikroorganisme tersebut (Leijh *et al.*, 1986). Makrofag merupakan sel fagosit yang memegang peranan penting pada sistem pertahanan tubuh manusia, baik sistem imun alamiah maupun adaptif (Abbas *et al.*, 2007). Makrofag dapat menelan sejumlah besar partikel tanpa menyebabkan kerusakan sel (Cannon dan Swanson, 1992). Suatu sistem yang menggunakan *latex beads* merupakan model fagositosis yang banyak digunakan hingga analisis fagosom berkembang sebagaimana kemajuan terkini (Desjardins dan Griffiths, 2003). *Lysteria monocytogenes* telah digunakan secara luas sebagai model dalam eksperimen mempelajari respon imun terhadap infeksi bakteri intraseluler (Fehr *et al.*, 1997). Menurut Wagner *et al.*, (1999), hasil uji *in-vitro* tidak selalu berkorelasi dengan uji *in vivo*, maka diperlukan konfirmasi dengan uji secara *in-vivo*. Hasil penelitian ini melaporkan tentang aktivitas fagositosis dari makrofag peritoneal mencit secara *in-vivo* yang diberi perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan tumbuhan berupa daun sirih merah (*Piper crocatum*) diambil di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T), Karanganyar Jawa Tengah pada bulan Mei 2010. Determinasi tanaman dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Bahan untuk isolasi senyawa kode Pc-2 yakni ekstrak metanolik daun sirih merah, kloroform pa, n-heksana pa, etil asetat pa, metanol pa, dan silica gel 60. Bahan untuk uji fagositosis makrofag yakni kloroform, *Free Hank's Balanced Sal solution (CMFF-HBSS)*, *Medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI)*, etanol 70%, akuabides, *Phosphate Buffer Saline (PBS)*, akuades steril, metanol absolut, *coverslips* bulat, *latex beads* diameter 3µm, Giemsa 20%, Glutamin, Penisilin, Sterptomisin, *Fetal Bovine Serum (FBS)*. Mencit BALB/c diperoleh dari Laboratorium Farmakologi sedang bakteri *Lysteria monocytogenes* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM.

Kelaikan etik diproses dan mendapat persetujuan dari komisi *ethical clearance* untuk penelitian praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM.

Alat

Alat untuk isolasi senyawa kode Pc-2 yakni *sintered glass*, *magnetic stirer*, kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis preparative (KLTP). Alat untuk uji fagositosis makrofag yakni spuit injeksi 1 ml, 3 ml, dan 10 ml, sonde, pipa kapiler, tabung eppendorf, neraca elektronik, inkubator CO₂ 5% 37°C, lempeng mikro 24 sumuran, *coverslip*, alat sentrifugasi, *ultrasonic processor*, *Laminar Air Flow Hood*, haemositometer, *inverted microscope*, dan optilab.

Metode

Isolasi senyawa kode Pc-2.

Isolasi senyawa kode Pc-2 dilakukan dari ekstrak metanolik daun sirih merah, ekstrak tersebut diperoleh secara maserasi (Hartini *et al*, 2011). Ekstrak difraksinasi dengan metode KCV (*vacuum liquid chromatography/VLC*) (Coll dan Bowden, 1986) berturut-turut dengan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, dan terakhir metanol sehingga didapat 5 fraksi. Senyawa yang diisolasi adalah senyawa berwarna ungu dengan penanda bercak yang meredam UV 254 nm, tak tampak pada UV 366, dan berwarna coklat pada deteksi dengan serum sulfat, dengan fase gerak kloroform : etil asetat (9:1) mempunyai R_f 0.25, senyawa tersebut terdapat pada fraksi III dan Fraksi IV hasil pemisahan secara KVC dari ekstrak metanolik daun sirih merah. Fraksi dilarutkan dalam kloroform : metanol (1:1) kemudian ditotolkan pada lempeng KLTP (*preparative TLC plate*) dari totalan fraksi tampak kering, lempeng diekspansi dalam bejana berisi fase gerak yakni kloroform : etil asetat (9:1) sampai fase geraknya mencapai 1 cm di bawah ujung lempeng. Lempeng diangkat dari bejana, ditunggu kering kemudian dilihat di bawah UV254 nm, bercak yang meredam ditandai dengan jarum, untuk kemudian dikerok. Hasil kerokan dikumpulkan, dilarutkan dengan kloroform:metanol (1:1) kemudian disaring, diuapkan, hingga didapat isolat berupa kristal. Deteksi kebenaran dan kemurnian isolat dilakukan dengan KLT menggunakan standar senyawa isolat 2 hasil isolasi Kustiawan.

Uji aktivitas fagositosis makrofag mencit yang diberi perlakuan senyawa Pc-2.

Mencit BALB/c jantan berat sekitar 20-30 gram sebanyak 18 ekor diaklimatisasi selama seminggu kemudian dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing terdiri dari 3 mencit. Kelompok I, III, dan V diberi perlakuan dengan 0,75 ml CMC Na 1%, kelompok II, IV, dan VI diberi perlakuan dengan 0.75 ml suspensi senyawa Pc-2 dalam CMC Na1% dengan dosis 10 mg/kgbb, masing-masing diberikan setiap hari selama 14 hari secara peroral. Pada hari ke-15 (hari ke nol infeksi) semua mencit diinfeksi dengan 0.2 ml 5×10^3 cfu/ml *Lysteria monocytogenes* secara intra peritoneal. Pada hari ke-3 setelah diinfeksi *L. monocytogenes*, mencit kel I dan II dikorbankan, diambil makrofag peritoneal dari cairan peritoneum untuk uji aktivitas fagositosis makrofag. Selanjutnya pada hari ke-

10 setelah infeksi *L. monocytogenes* untuk mencit kel III dan IV, sedangkan hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes* untuk mencit kel V dan VI.

Isolasi dan kultur sel makrofag. Mencit dikorbankan dengan cara dimasukkan *chamber* berisi kloroform, setelah tampak tak bergerak mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritonealnya dengan alkohol 70%. Disuntikkan 10 ml media RPMI dingin ke rongga peritoneum, ditunggu sekitar 3 menit sambil rongga peritoneumnya ditekan-gulingkan secara perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara diaspirasi dengan jarum suntik, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus, kemudian dimasukkan ke tabung sentrifus. Aspirat disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 1 ml medium komplit dan ditentukan viabilitasnya dengan *trypan blue* kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung diukur pada sumuran *microplate* 24 yang telah diberi *coverslip* bulat, setiap sumuran 200 μ l (5×10^5 sel). Diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium RPMI komplit 1ml/sumuran dan diinkubasikan lagi selama 2 jam. Sel dicuci dua kali menggunakan media RPMI kemudian ditambahkan medium komplit 1 ml/sumuran dan inkubasi selama 24 jam. Sel makrofag siap untuk diuji aktivitasnya (Wijayanti, 1996).

Uji aktivitas fagositosis. Digunakan *latex beads* diameter 3 μ m, yang diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml. Makrofag yang sudah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2 x dengan RPMI. Suspensi lateks ditambahkan 200 μ l (5×10^6)/sumuran atau kepadatan lateks dalam 1 ml = $2,5 \times 10^7$, dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% pada 37°C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci 3 kali menggunakan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagositosis, dikeringkan pada suhu ruangan, dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik kemudian metanol dibuang, ditunggu sampai kering. Setelah kering, *coverslip* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit, dicuci dengan akuades, dikeringkan pada suhu ruangan, dan diangkat dari sumuran kultur. Aktivitas sel yang memfagositosis partikel lateks dihitung dengan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 400x. Masing-masing suspensi makrofag yang diperiksa dilakukan replikasi 3 kali (3 *coverslip*), dan dari setiap *coverslip* dihitung sejumlah 100 makrofag, rata-rata dan standard deviasi dihitung dari 3 *coverslip* (Wahyuniari, 2006; Derre and Isberg, 2004).

Analisis data

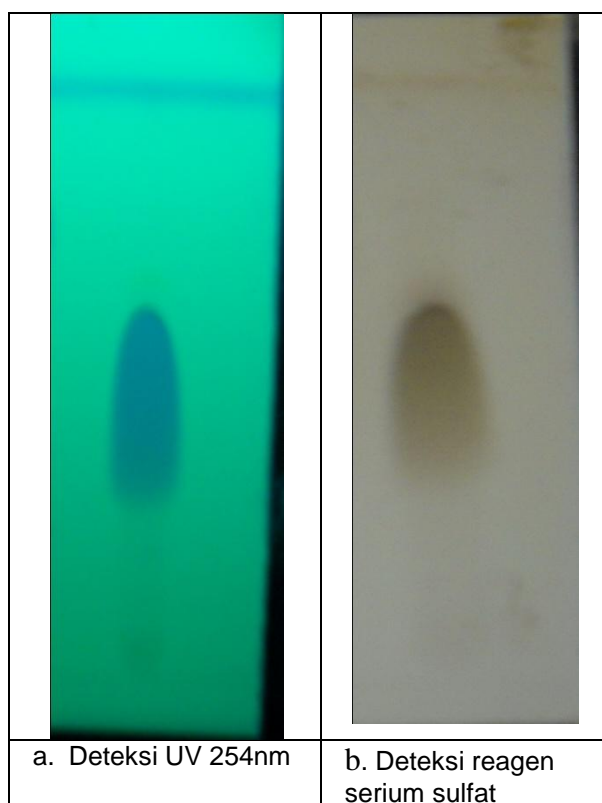
Aktivitas fagositosis dinyatakan dalam 3 parameter yakni indeks fagositosis (IF), persen fagositosis (PF), dan efisiensi fagositosis (EF) (Sanchez *et al.*, 2008). Indeks fagositosis adalah jumlah lateks yang dimakan oleh 100 makrofag yakni 100 dibagi jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* dikalikan jumlah lateks yang dimakan makrofag dalam 3 *coverslip*. Persen fagositosis adalah persen sel yang makan minimal 1 lateks yakni jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* yang makan minimal 1

lateks dibagi jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* dikalikan 100%. Efisiensi fagositosis adalah rasio antara indeks fagositosis dan persen fagositosis. Analisis statistik menggunakan uji anova satu jalan, uji Tukey, dan uji korelasi Pearson.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

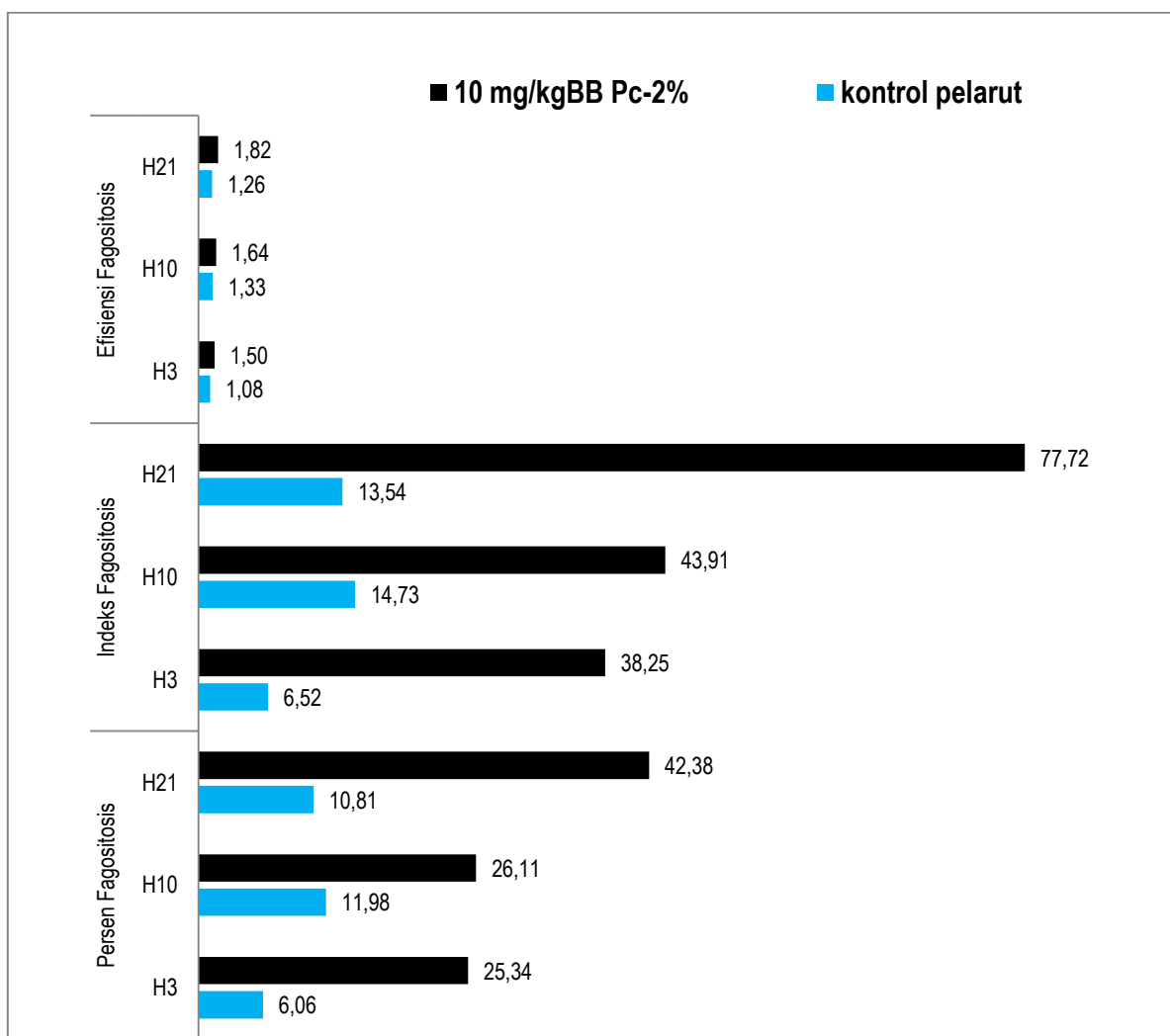
Determinasi tanaman menunjukkan nama ilmiah tanaman yang diteliti adalah *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol terhadap 1,9 kg serbuk daun sirih merah yang berasal dari pengeringan 8,26 kg daun basah menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam sebanyak 224,03 g. Rendemen serbuk terhadap daun basah sebesar 23%, rendemen ekstrak terhadap daun basah sebesar 2,7%, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk sebesar 11,8% (Hartini *et al.*, 2011). Isolasi senyawa kode Pc-2 dari 2.12 gram ekstrak metanolik daun sirih merah menghasilkan 12,1 mg isolat yang murni secara KLT, atau rendemen senyawa Pc-2 terhadap ekstrak metanolik daun sirih merah sebesar 0.57%.



Gambar 2. Kromatogram lapis tipis isolat senyawa Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Senyawa kode Pc-2 yang diisolasi tersebut berwarna ungu pada UV 254, tak tampak pada UV 366, berwarna coklat pada deteksi dengan serum sulfat serta mempunyai harga Rf 0.25 pada gerak kloroform : etil asetat (9:1), mempunyai Rf 0.25 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1), dan Rf 0.19 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1). mempunyai Rf 0.75 TLC, dan tampak bercak tunggal pada ketiga kromatogram KLT tersebut. Senyawa kode Pc-2 hasil isolasi dari ekstrak metanolik daun sirih merah sama dengan isolat 2 yang diisolasi oleh Kustiawan (2012).

Uji aktivitas fagositosis secara *in-vivo* menunjukkan bahwa persen fagositosis (PF) maupun indeks fagositosis (IF) kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 meningkat dari hari ke-3, hari ke-10, dan hari ke-21 setelah infeksi dengan *Lysteria monocytogenes*, sedangkan pada kelompok kontrol pada hari ke-21 terjadi penurunan. Efisiensi fagositosis (EF) yang merupakan rasio antara PF dan IF juga mempunyai pola yang demikian.



Gambar 3. Aktivitas fagositosis makrofag pada hari ke-3, ke-10, dan ke-21 setelah mencit diinduksi *L. monocytogenes*

Pembahasan

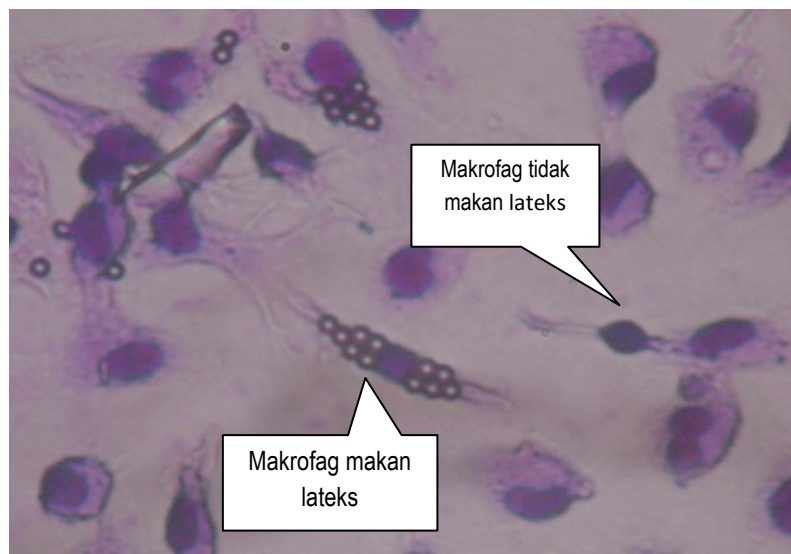
Senyawa kode Pc-2 hasil isolasi dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz Pav.) merupakan senyawa murni secara KLT, dan menurut Kustiawan (2012) senyawa tersebut adalah *2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3",4",5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone*.

Pemberian senyawa kode Pc-2 dengan dosis 10 mg/kgbb pada mencit BALB/c jantan selama 14 hari mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit baik pada hari ke-3, hari ke-10, maupun hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan bakteri *Lysteria monocytogenes*. Uji statistik dari data hasil uji fagositosis kelompok perlakuan 10 mg/kgBB senyawa Pc-2 maupun kelompok kontrol menunjukkan distribusi data homogen, dan hasil uji anova satu jalan yang dilanjutkan ke uji Tukey menunjukkan adanya perbedaan bermakna PF, IF, maupun EF kelompok perlakuan dan kelompok kontrol tersebut.

Persen fagositosis (PF) adalah persen sel yang makan minimal 1 lateks yakni jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* yang makan minimal 1 lateks dibagi jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* dikalikan 100%. Jumlah makrofag yang terdapat dalam 3 *coverslip* yang terhitung yakni antara 226 sampai 601 sel. Jumlah makrofag yang makan lateks pada mencit kelompok perlakuan lebih tinggi dari mencit kelompok kontrol, dan terjadi peningkatan dari hari ke-3, hari ke-10, dan tertinggi pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*. Indeks fagositosis (IF) adalah jumlah lateks yang dimakan oleh 100 makrofag yakni 100 dibagi jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* dikalikan jumlah lateks yang dimakan makrofag dalam 3 *coverslip* pandang. Jumlah lateks yang dimakan per makrofag antara 1 sampai 11 lateks. Jumlah lateks yang dimakan per makrofag pada mencit kelompok perlakuan lebih tinggi dari mencit kelompok kontrol, dan terjadi peningkatan dari hari ke-3, hari ke-10, dan tertinggi pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*. Peningkatan tajam PF dan IF karena pemberian senyawa Pc-2 terjadi pada hari ke-21, sedangkan kelompok kontrol justru menunjukkan penurunan PF dan IF, hal ini terjadi mungkin disebabkan mencit pada kelompok kontrol kurang mampu menanggulangi patogen tersebut sehingga terjadi penurunan PF maupun IF, sedangkan perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 justru mampu mengaktivasi makrofag untuk memakan lateks baik dalam hal jumlah sel makrofag yang memakan lateks maupun jumlah lateks yang dimakan oleh makrofag yang bersangkutan, sehingga PF dan IF meningkat tajam.

Efisiensi fagositosis adalah rasio antara indeks fagositosis dan persen fagositosis. Indeks fagositosis maupun persen fagositosis kelompok perlakuan lebih tinggi dari kelompok kontrol, dan terjadi peningkatan dari hari ke-3, hari ke-10, dan tertinggi pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*, hal ini menunjukkan bahwa pemberian senyawa kode Pc-2 mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Peningkatan aktivitas fagositosis terjadi bukan hanya pada jumlah

sel makrofag yang aktif tetapi juga pada tingkat aktivitas fagositosis tiap sel makrofag yang bersangkutan.



Gambar 4. Fagositosis lateks oleh makrofag peritoneal mencit setelah diinfeksi dengan *L. monocytogenes*

Uji Tukey pada aktivitas fagositosis kelompok kontrol yakni kelompok I, III, dan V pada hari ke-3, hari ke-10, dan hari ke-21 menunjukkan perbedaan tidak bermakna baik pada parameter IF, PF maupun EF. Pemberian pelarut yakni CMC Na 1% tidak menyebabkan perubahan aktivitas fagositosis makrofag mencit pada hari ke-3, hari ke-10, dan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*.

Hasil uji statistik untuk kelompok perlakuan untuk parameter PF, uji Tukey kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok II, IV, dan VI. Hal ini menunjukkan bahwa PF akibat pemberian senyawa Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menyebabkan jumlah sel makrofag yang aktif memakan lateks berbeda baik pada hari ke-3, hari ke-10, maupun pada hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Untuk parameter IF, uji Tukey kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok II dan kelompok VI, serta antara kelompok IV dan kelompok VI, yang berarti bahwa perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menyebabkan sel makrofag memakan lateks dengan jumlah yang berbeda pada hari ke-3 dengan hari ke-21, dan pada hari ke-10 dengan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Tidak terdapat perbedaan jumlah lateks yang dimakan sel makrofag pada hari ke-3 dengan hari ke-10 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Untuk parameter EF, uji Tukey kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok II dan VI untuk parameter EF. Hal ini

menunjukkan ada perbedaan rasio IF dengan PF akibat pemberian senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb pada hari ke-3 dengan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Tidak terdapat perbedaan EF pada hari ke-3 dengan hari ke-10, maupun hari ke-10 dengan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*.

Uji korelasi Pearson menunjukkan bahwa ada korelasi antara IF dengan EF, juga antara PF dengan EF, sedangkan antara IF dengan PF tidak ada korelasi. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel makrofag yang aktif memakan lateks tidak ada hubungannya dengan jumlah lateks yang dimakan oleh sel makrofag.

Kesimpulan

1. Senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) merupakan senyawa murni secara KLT berupa kristal berwarna putih meredam dan berwarna ungu pada deteksi dengan UV 254, tidak berwarna pada UV 366, berwarna coklat pada deteksi dengan reagen serum sulfat, mempunyai harga Rf 0.25 pada fase gerak kloroform : etil asetat (9:1), mempunyai Rf 0.19 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1), dan Rf 0.75 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1).
2. Senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada dosis 10 mg/kgbb mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit yang diinduksi dengan bakteri *Lysteria monocytogenes* baik pada parameter indeks fagositosis, persen fagositosis maupun efisiensi fagositosisnya.
3. Tidak ada korelasi antara indeks fagositosis dan persen fagositosis makrofag peritoneal mencit yang diberi perlakuan dengan 10 mg/kgbb senyawa kode Pc-2 dan diinduksi dengan *Lysteria monocytogenes*.

Daftar Pustaka

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia
- Agustanti, L. 2008. Potensi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Aktivator Enzim Glukosa Oksidase, *Skripsi*, Prodi Biokimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Alfarabi, M., Bintang M., Suryani, Safitri, M. 2010. The Comparative Ability of Antioxidant of Piper crocatum in Inhibiting Fatty Acid Oxidation and Free Radical Scavenging. *Hayati- Journal of Biosciences*. 17,4,201-204.
- Apriyanto, S. 2011. Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lamk) terhadap Proliferasi Sel Limfosit dan Fagositosis Makrofag pada Tikus yang diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Bafna A.R. dan Misra S.H. 2004. Immunomodulatory activity of methanol extracts of flower-heads of *Sphaeranthus indicus* Linn. *Ars Pharm*. 45 (3): 281-291.
- Cannon G.J. dan Swanson J.A. 1992. The Macrophage Capacity for Phagocytosis. *Journal of Cell Science*. 101:907-913.
- Coll, J.C. dan Bowden, B.F. 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to The Separation of Terpene Mixtures. *Journal of Natural Products*. 49, 934-936.

- Dhewayanti, I.N. 2010. Efektivitas Infusa daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Skripsi*. Fak. Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Derre, I. dan Isberg, R.R. 2004. Macrophages from Mice with the Restrictive Lgn1 Allele Exhibit Multifactorial Resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 72(11): 6221-6229.
- Desjardins M. dan Griffiths G. 2003. Phagocytosis : latex leads the way. *Current Opinion in Cell Biology.* 15:498-503.
- Fehr T., Schoedon G., Odermatt B., Holtschke T., Schneemann M., Bachmann M.F., Mak T.W., Horak I., dan Zinkernagel R.M. 1997. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J Exp Med.* 197 Mar 3;185(5):921-31.
- Fitriyani, A., Winarti, L., Muslichah, S., dan Nuri, Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Tikus Putih, 2011. *Majalah Obat Tradisional.* 16.
- Hartini, Y.S., Wahyuono, S., Widyarani, S., dan Yuswanto, A. 2011. Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Ekstrak Metanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* ruiz & pav.) Secara *In Vitro*, *Prosiding*, ISBN 9786029187168. Seminar Nasional Pemberdayaan Pasien dalam Self Management Diabetes Melitus untuk Meningkatkan Kualitas Hidup. Fakultas Farmasi Univ. Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Iwo M.M., Fidrianny I., dan Martadiputra A. 2008. Kajian Efek Immunomodulator Ekstrak Air Herba Tapak Dara (*Chataranthus roseus* L..G.Don) pada mencit ddY. *Prosiding Kongres Ilmiah XVI ISFI 2008*. Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia. Jakarta. Hal: 167-171.
- Juliantina, F., Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T., dan Bowo TE.T. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *JKKI* Vol.1 No. 1 April 2009. Universitas Islam Indonesia Yogyakarta
- Kumar, S., Gupta, P., Sharma, S., dan Kumar, D. 2011. A Review on Immunostimulatory Plants, *Journal of Chinese Integrative Medicine.* 9, 1-18.
- Kustiawan, P.M., Wahyuono, S., dan Yuswanto, A., 2012, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Immunostimulan Non Spesifik In Vitro dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). *Thesis*. Program Pascasarjana Fakultas Farmasi UGM
- Leijh, P.C.J., Furth, R.V., dan Van Zwet, T.L. 1986. In Vitro Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes, dalam *Cellular Immunology* (Weir, D.M., ed.). Blackwell Scientific Publications, Fourth Ed, Oxford.
- Manoi, F. 2007. Sirih Merah sebagai Tanaman Obat Multi Fungsi, *Warta Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*. 13, 2-6.
- Pangabdian S. 2012. The effective concentration of red betel leaf (*Piper crocatum*) infusion as root canal irrigant solution. *Media Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi).* Volume : 45 - No. 1 - 2012-03-01
- Safitri, M. dan Fahma, F. 2008. Potency of *Piper crocatum* Decoction as an Antihyperglycemia. *Hayati, Journal of Bioscience.* 15,
- Sanchez, S., Paredes, S.D., Sanchez, C.L., Barriga, C., Reiter, R.J., and Rodriguez, A.B. 2008. Tryptophan Administration in rats Enhances Phagocytic Function and Reduces Oxidative Metabolism. *Neuro Endocrinol Lett.* Dec; 29 (6): 1026-1032.
- Setyowati, N.S. 2011. Studi komparatif komponen kimia penyusun minyak atsiri daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), sirih hijau (*Piper betle* L.), lada (*Piper nigrum* L.) dan kemukus (*Piper cubeba* L.). *Skripsi*.
- Sulistiyani, N., Sasongko, H., Hertanti, M., dan Lana, L.M. 2007. Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* serta Identifikasi Komponen Kimianya. *Media Farmasi.* 6, 33-39, Yogyakarta.
- Sundari, H. 2010. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). *Skripsi*. Prodi Farmasi FMIPA, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Suratmo. 2008. Aktivitas Antioksidan dan antikanker Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*). *Tesis*. Prodi Ilmu Kimia Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Sustri L., Aryani, N., dan Lukistyowati, I. 2011. Sensitivitas Larutan Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan *Edwardsiella tarda* . *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.
- Wagner, H., Kraus, S., dan Jurcic, K. 1999. Search for Potent Immunostimulating Agents from Plants and Other Natural Sources, dalam *Immunomodulatory Agents from Plants*, (Wagner, H., ed.). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Wagner, H., Kraus, S., dan Jurcic, K. 1999. Search for Potent Immunostimulating Agents from Plants and Other Natural Sources, dalam *Immunomodulatory Agents from Plants*, (Wagner, H., ed.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Wahyudi, Y..2010, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrakn-heksana Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk.) terhadap Peningkatan Titer Immunoglobulin G pada Tikus Terinduksi Vaksin Hepatitis B dan Uji Histopatologinya. *Skripsi*. Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wahyuniari, I.A.I. 2006. Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamp) pada Respon Imun Seluler Setelah Infeksi *Listeria monocytogenes*. *Tesis*. Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wardhana, P.W. 2011. Efek Antihiperglikemik Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret.
- Wicaksono, B.D., Handoko, Y.A., Arung, E.T., Kusuma, I.W., Yulia, D., Pancaputra, A.N., dan Sandra, F. 2009. Antiproliferative Effect of Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells In Vitro, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8:345-352.
- Wijayanti, M.A., Supriyono, dan Fitri, L.K. 1999. Sekresi Tumor Necrosis Factor dan Reactive Oxygen Intermediate oleh Makrofag Peritoneum Mencit yang distimulasi dengan Antigen Telarut *Plasmodium falciparum*. *Berkala Ilmiah Kedokteran*. 31, 23-27.
- Wiweko, O.D. 2010. Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk) terhadap Peningkatan Titer Immunoglobulin G dan Histopatologi Tikus yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B. *Skripsi*. Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Yulianti, E., Rahayu, T., Mercuriani, I.S., 2011. Potensi Ekstrak Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Sebagai Antikanker. *Skripsi*. Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta
- Zubier, F., Bramono, K., Widaty, S., Nilasari, H., Louisa, M., dan Rosana, Y. 2010. Efikasi Sabun Ekstrak Sirih Merah dalam Mengurangi Gejala Keputihan Fisiologis. *Majalah Kedokteran Indonesia*. Volume: 60, Nomor: 1, Januari 2010.